

NEW MICROORGANISM OK4 STRAIN AND BIOLOGICAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE USING THE MICROORGANISM

Publication number: JP2001069968

Publication date: 2001-03-21

Inventor: IMAMURA TAKESHI

Applicant: CANON KK

Classification:

- international: **C12P7/62; C12N1/20; C12R1/00; C12P7/62; C12N1/20;**
(IPC1-7): C12N1/20; C12P7/62; C12N1/20

- european:

Application number: JP19990251879 19990906

Priority number(s): JP19990251879 19990906

Report a data error here

Abstract of **JP2001069968**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new microorganism which can simultaneously simply produce polyhydroxyalkanoates containing hydroxybutyric acid and so on as monomer units, respectively, as biodegradable polyesters in high yields. **SOLUTION:** This microorganism can simultaneously produce polyhydroxyalkanoates containing 3-hydroxybutyric acid and a 3-3- hydroxy-5-(4-substituted phenyl) valeric acid of formula I (R is H or CH₃) as monomer units, respectively. The method for biologically producing the polyhydroxyalkanoates comprises preferably culturing the new microorganism: Burkholderia sp. OK4 strain (FERM P-17371) in a culture medium containing a 5-(4-substituted phenyl) valeric acid of formula II and then extracting the polyhydroxyalkanoates containing 3-hydroxybutyric acid and the 3-hydroxy-5-(4- substituted phenyl) valeric acid of formula I (R is common to that of the compound of formula II) as monomer units, respectively, from the culture product.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-69968

(P2001-69968A)

(43)公開日 平成13年3月21日(2001.3.21)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20

A 4 B 0 6 4

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

4 B 0 6 5

// (C 1 2 N 1/20

C 1 2 R 1:00)

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平11-251879

(22)出願日 平成11年9月6日(1999.9.6)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤ

ノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 暢之 (外2名)

Fターム(参考) 4B064 AD83 BE07 BH07 CA02 CC03

CC15 CD07 CE08 DA16

4B065 AA01X AC14 BA22 BB08

BD15 BD16 CA12 CA54

(54)【発明の名称】 新規微生物OK 4株およびその微生物を用いたポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法

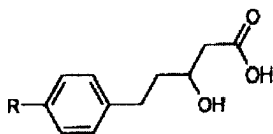
(57)【要約】

【課題】 3-ヒドロキシ酪酸と、3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸類をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを同時に生産・蓄積する新規微生物の提供。

【解決手段】 3-ヒドロキシ酪酸と、下記一般式

(1) :

【化1】



(1)

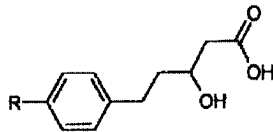
(式中、RはHまたはCH₃を表す)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを同時に生産する新規微生物バークホルデリア・スピーシーズ (Burkholderia sp.) OK 4株 (FERM P-17371)。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3-ヒドロキシ酪酸と、下記一般式

(1) :

【化1】

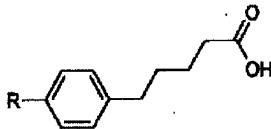


(1)

(式中、RはHまたはCH₃を表す)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを同時に生産する新規微生物バークホルデリア・スピーシズ (*Burkholderia* sp.) OK 4 株 (FERM P-17371)。

【請求項2】 前記請求項1記載のバークホルデリア・スピーシズ (*Burkholderia* sp.) OK 4 株 (FERM P-17371) を、下記一般式 (2) :

【化2】



(2)

(式中、RはHまたはCH₃を表す)で示される5-(4-置換フェニル)吉草酸を含む培地中で培養した後、3-ヒドロキシ酪酸と、前記一般式 (1) で示され、前記一般式 (2) とRを共通とする3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを前記培養物から抽出することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法。

【請求項3】 前記ポリヒドロキシアルカノエートの抽出に、クロロホルムを用いることを特徴とする請求項2に記載のポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法。

【請求項4】 前記ポリヒドロキシアルカノエートの抽出に、次亜塩素酸塩を用いることを特徴とする請求項2に記載のポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法。

【請求項5】 前記培地は、ノナン酸またはラウリン酸のいずれかを含むことを特徴とする請求項2~4のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生分解性ポリエステルを生産能を有する新規微生物、ならびに前記微生物を用いる生分解性ポリエステルの生物的生産方法に関する。具体的には、生分解性ポリエステルとして、3-ヒドロキシ酪酸と、3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェ

ニル)吉草酸類をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを同時に生産・蓄積する新規微生物、およびその微生物を用いて、前記3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸類をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの同時生産方法に関する。

【0002】

【従来の技術】長年にわたって、石油由来の合成高分子を、プラスチック等として利用してきたが、生活廃棄物に含まれるこれらプラスチック等の処理が大きな社会問題となっている。石油由来の合成高分子材料は、分解されにくい利点から、過去において、金属材料、ガラス等の代替えを果たしてきたが、大量に消費され、また大量に廃棄される昨今では、その分解されにくいという性質が逆に災いし、廃棄物処理場に蓄積されることとなった。また、焼却処理を行うと、CO₂排出量の増加となり、ある場合には、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物質の発生原因ともなる。このような環境への影響を配慮して、従来の石油由来の合成高分子材料に代えて、一定の強度・耐久性は維持するものの、最終的には、自然に存在する各種微生物等により分解可能な生分解性高分子材料の利用が検討され、一部実用化が進みつつある。

【0003】例えば、ポリ3-ヒドロキシブチレート (PHB) に代表される微生物産生ポリエステル (ポリヒドロキシアルカノエート; PHA) は、生物により分解されうという特性を有しており、前記の生分解性高分子材料としての応用が検討されている。すなわち、微生物産生ポリエステルは、再び微生物等により生分解されるので、最終的には、自然の物質循環に取り込まれる。つまり、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。また、医療用軟質部材としても、今後一層有用視される可能性を有している (特開平5-159号公報、特開平6-169980号公報、特開平6-169988号公報、特開平6-225921号公報などを参照)。

【0004】これまで、多くの細菌が、ポリ3-ヒドロキシブチレート (PHB)、あるいは3-ヒドロキシブチレートとその他のヒドロキシアルカノエートとのコポリマーを菌体内に生成・蓄積することが報告されている (「生分解性プラスチックハンドブック」 (生分解性プラスチック研究会編; (株)エヌ・ティー・エス)、p.178-197などを参照)。例えば、アルカリゲネス・ユウトロファス H16 株 (*Alcaligenes eutropus* H16; ATCC No. 17699) ならびにその変異株は、これらポリマーの生産に関し詳細に研究されている。すなわち、基質となる炭素源を変化させることによって、3-ヒドロキシブチレート (3HB; 3-ヒドロキシブタン酸) と3-ヒドロキシバレレート (3HV; 3-ヒドロキシペンタン酸) の共重合体または両者の各単位を共に含有成分とす

る共重合体を様々な割合で生成することが公表されている(特表平6-15604号公報、特表平7-14352号公報、特公平8-19227号公報などを参照)。

【0005】また、特許公報第2642937号には、シュドモナス・オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC 29347株に、炭素源として非環状脂肪酸炭化水素を与えることにより、炭素数が6から12までの3-ヒドロキシアルカノエート(3HA: 3-ヒドロキシアルカン酸)をモノマーユニットとするポリエステルを生産することが開示されている。

【0006】特開平5-74492号公報には、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)属、パラコッカス(*Paracoccus*)属、アルカリゲネス(*Alcaligenes*)属、シュドモナス(*Pseudomonas*)属のバクテリアを、炭素数3から7の第一級アルコールに接触させることにより、3HBと3HVの共重合ポリエステルを生産せしめる方法が開示されている。

【0007】特開平5-93049号公報、および特開平7-265065号公報には、アエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)を、不飽和脂肪酸のオレイン酸(2-9-オクタデセン酸)やオレイン酸等の不飽和脂肪酸を多く含むオリーブオイルを炭素源として培養することにより、3HBと3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx: 3-ヒドロキシヘキサン酸)の2成分共重合ポリエステルを生産することが開示されている。

【0008】特開平9-191893号公報には、コマモナス・アシドボランス(*Comamonas acidovorans*) IFD 13852株を、炭素源としてD-グルコン酸及び1,4-ブタンジオールを含む培地を用いて培養することにより、3HBと4-ヒドロキシシブチレート(4HB: 4-ヒドロキシシブタン酸)をモノマーユニットに持つポリエステルを生産することが開示されている。

【0009】更に、これら微生物が産生するポリエステルに、種々の機能性を付与するため、様々な置換基の導入がなされてきている。これら置換基導入等に関しては、例えば、FEMS Microbiology Letters, 128 (1995) p.219-228などに詳細に記載されている。導入される置換基(官能基)には、例えば、不飽和炭化水素基、エステル基(ラクトン構造など)、アリール基(芳香環)、シアノ基、ハロゲン化炭化水素基、エポキシ基(エポキシ化)等が挙げられる。

【0010】このように、微生物生産ポリエステルであるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)は、モノマーユニットに様々な置換基を導入することより様々な機能を示すものが得られているが、その利用範囲をより広げる上では、更に広範囲なモノマーユニットを含んだPHAを生産する方法が望まれる。また、前記のPHAを生産する微生物の探索・開発が必要となる。

【0011】例えば、アリール基をモノマーユニット分子内に含むPHAを生産する微生物としては、これま

で、3-ヒドロキシ-5-フェニルバレリアン酸(3HPV: 3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、上記一般式(1)でR=Hの化合物)をモノマーユニットとしてPHA中に導入する菌株として、シュドモナスオレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*)の一株が報告されているのみである(Macromolecules, 24, p.5256-5260 (1991)を参照)。前記報告、ならびにInternational Journal of Biological Macromolecules, 19, p.29-34 (1996)を参照すると、前記菌株はノナン酸あるいはオクタン酸を増殖基質とし、培地に添加する5-フェニルバレリアン酸(PVA: 5-フェニルペンタン酸)から、3HPVをモノマーユニットとして含むPHAを生産する。また、この時同時に生産される他のPHAのモノマーユニットは、3-ヒドロキシ吉草酸(3HV: 3-ヒドロキシペンタン酸)、3-ヒドロキシヘキサン酸(3HHx)、3-ヒドロキシヘプタン酸(3HHp)、3-ヒドロキシオクタン酸(3HO)、3-ヒドロキシノナン酸(3HN)、3-ヒドロキシデカン酸(3HD)、3-ヒドロキシドデカン酸(3HDO)であり、一般的なPHAの主成分である3-ヒドロキシ酪酸(3HB: 3-ヒドロキシブタン酸)ユニットは含まれていない。さらに、Macromolecules, 29, p.1762-1766 (1996)には、5-(p-トリル)バレリアン酸(5-(p-トリル)ペンタン酸)、5-(4-エチルフェニル)バレリアン酸(5-(4-エチルフェニル)ペンタン酸)、5-(4-ビフェニル)バレリアン酸(5-(4-ビフェニル)ペンタン酸)、8-(p-トリル)オクタン酸を基質として、それぞれの基質化合物に対応する芳香環を含んだPHAを生産することが記載されている。また、Macromolecules, 29, p.3432-3435 (1996)には、6-フェノキシヘキサン酸、8-フェノキシオクタン酸、11-フェノキシウンデカン酸を基質として、それぞれの基質化合物に対応する芳香環を含んだPHAを生産することが記載されている。しかしながら、モノマーユニットに3HBは含まれていない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】一方、様々なニーズに対応して、多様な物性のPHAが望まれており、例えば、これまで報告のない、3HBとフェニル基などのアリール基を置換基として含む3-ヒドロキシアルカン酸(3HA)を同時に含むコポリマーの生産方法が強く望まれている。また、前記のコポリマーを生産する微生物の探索・開発にも、大きな期待が掛けられている。

【0013】本発明は、上記の課題を解決するものであり、本発明の目的は、3HBと、下記一般式(1)で示される3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを同時に生産する新規な微生物を提供することにある。また、本発明の目的は、前記の微生物を利用して、3HBと、下記一般式(1)で示される3-ヒドロ

キシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法を提供することにある。

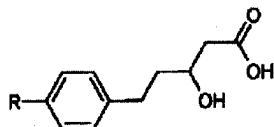
【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記の課題を解決するため、新規に各地から採取した土壌から多数の菌株を単離し、5-フェニルバレリアン酸(PVA: 5-フェニルペンタン酸)を単一炭素源とする選択培地において生育するPVA資化増殖微生物を選別した。更に、選別されたPVA資化増殖微生物の複数菌株について、その属の同定、ならびに、ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)の生産性を調べたところ、ノナン酸と5-フェニルバレリアン酸を基質(炭素源)として培養する際、3-ヒドロキシブタン酸(3HB)ならびに3-ヒドロキシ-5-フェニルバレリアン酸(3HPVA)をモノマーユニットとして含むPHAを同時に生産する能力を示す菌株の存在を見出した。このうち、前記のPHA生産性を有し、バークホルデリア・スピーズ(*Burkholderia* sp.)と同定できる菌株は、新規な菌株と判断され、そのうち、一つの菌株をバークホルデリア・スピーズ(*Burkholderia* sp.) OK 4株として、通産省 工業技術院 生命工学工業技術研究所(生命研(NIBH))に寄託した(寄託番号: FERM P-17371)。また、このOK 4株は、更に、下記一般式(2)で示される5-(4-置換フェニル)バレリアン酸を含む培地で培養すると、3-ヒドロキシブタン酸(3HB)ならびに対応する3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)バレリアン酸をモノマーユニットとして含むPHAの生産性を示すことを見出した。かかる知見に基づき、本発明を完成するに至った。

【0015】すなわち、本発明のポリヒドロキシアルカノエート生産性を有する微生物は、3-ヒドロキシ酪酸と、下記一般式(1)：

【0016】

【化3】



(1)

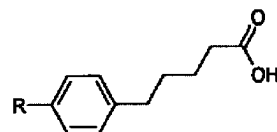
(式中、RはHまたはCH₃を表す)で示される3-ヒ

ドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを同時に生産する新規微生物バークホルデリア・スピーズ(*Burkholderia* sp.) OK 4株(FERM P-17371)である。

【0017】また、本発明のポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法は、前記バークホルデリア・スピーズ(*Burkholderia* sp.) OK 4株(FERM P-17371)を、下記一般式(2)：

【0018】

【化4】



(2)

(式中、RはHまたはCH₃を表す)で示される5-(4-置換フェニル)吉草酸を含む培地中で培養した後、3-ヒドロキシ酪酸と、前記一般式(1)で示され、前記一般式(2)とRを共通とする3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを前記培養物から抽出することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法である。

【0019】なお、上記のポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法において、前記ポリヒドロキシアルカノエートの抽出に、クロロホルムを用いると好ましい。同じく、前記ポリヒドロキシアルカノエートの抽出に、次亜塩素酸塩を用いることも好ましい。加えて、前記培地は、上記一般式(2)で示される5-(4-置換フェニル)吉草酸に加えて、ノナン酸またはラウリン酸(ドデカン酸)のいずれかを含む培地とすることが好ましい。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明の微生物であるOK 4株は、岡山県の土壌からPVAを単一炭素源とする選択培地によりPVA資化増殖微生物として取得された。

【0021】このOK 4株は、次の表1～3に纏める特徴を有する微生物である。

【0022】

【表1】

(1) 形態観察

試験項目	
細胞の形及び大きさ	桿菌 (0.3-0.5 × 1.0-2.0 μm)
胞子	無
鞭毛	有 (周鞭毛)
グラム染色性	
18 時間	陰性
24 時間	陰性
36 時間	陰性

【0023】

【表2】

(2) 生理・生化学試験

試験項目	
嫌気下での生育	陰性
カタラーゼ	陽性
OF テスト	酸化
糖からの酸の生成	
D-グルコース	陽性
L-アラビノース	陽性
D-フラクトース	陽性
D-ガラクトース	陽性
マルトース	陰性
ラクトース	陰性
シュークロース	陰性
D-キシロース	陽性
トレハロース	陽性
グリセロール	陽性
D-マンニトール	陽性
D-ソルビトール	陽性
ソルボース	陰性
D-マンノース	陽性
L-ラムノース	陽性
アドニトール(リビトール)	陰性
ガスの生成	
D-グルコース	陰性
L-アラビノース	陰性
D-キシロース	陰性
D-マンニトール	陰性

【0024】

【表3】

(3) キノン組成分析

組成比 (%)		
ユビキノン-8	ユビキノン-9	ユビキノン-10
Not detected	97.8	Not detected

以上の性質を有することから、本菌株、OK 4 株は、バークホルデリア スピーシズ (*Burkholderia* sp.) と同定するのが、適当であることが認められた。

【0025】 菌株は、このOK 4 株は、後述の菌株例は、

ノマーユニットとして含むPHAを同時に生産する能力があることが判明した。以上の特徴的な性質を示すことから、OK 4 株は、バークホルデリア属に属する新きな菌株であることが認められた。

培地のような無機塩培地に酵母エキスやペプトン等を0.2%~0.5%程度添加した培地を用いることができる。

【0027】一方、PHAを蓄積させる場合は、M9培地のような無機塩培地に、増殖用炭素源として、炭素数7~12程度の脂肪酸、例えば、ノナン酸(NA)やオクタン酸(OA)、デカン酸、ラウリン酸(ドデカン酸)等の中鎖の脂肪酸を0.1%~0.2%程度、及び一般式(2)に示される5-(4-置換フェニル)バレリアン酸を0.1%~0.2%程度添加した培地を用いて、対数増殖後期から定常期の時点まで培養し、菌体を遠心分離等で収穫する。次いで、この菌体を、窒素源が存在しない無機塩培地に、中鎖の脂肪酸を0.1%~0.2%程度、及び一般式(2)に示す5-(4-置換フェニル)バレリアン酸を0.1%~0.2%程度添加した培地で更に培養するという方法を採用することができる。

【0028】あるいは、始めから無機塩培地中の窒素源濃度を1/10程度に制限し、上記中鎖の脂肪酸を0.1%~0.2%程度、及び一般式(2)に示される5-(4-置換フェニル)バレリアン酸を0.1%~0.2%程度添加した培地で培養し、対数増殖後期から定常期の時点で菌体を収穫して、所望のPHAを抽出する方法を採用することもできる。

【0029】この様な培養には、バッチ式、流動バッチ式、連続培養式、リアクター形式等、通常微生物を培養する種々の方法を用いることができる。

【0030】先に述べた、PHAを蓄積させる際に利用される無機塩培地は、リン源(通常はリン酸塩)、窒素源(通常はアンモニウム塩、或いは硝酸塩)等、微生物が増殖しうる成分を含んでいるものならいかなるものでもよく、例えば、MSB培地、M9培地等を挙げることができる。本発明における実施例で用いるM9培地の組成を表4に示す。

【0031】

【表4】

M9培地の組成組成 (培地1リットル中; pH7.0)

成分	含有量
Na_2HPO_4	6.2 g
KH_2PO_4	3.0 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1.0 g

本発明のポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法においては、培養後、集菌される菌体から、目的のPHAを回収する手段には、通常行われているクロロホル

ム抽出が最も簡便である。例えば、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤処理、リゾチーム等の酵素処理、EDTA、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア等の薬剤処理によって、目的のPHA以外の菌体内成分を除去することによって、PHAを回収する方法を採用することもできる。なかでも、次亜塩素酸ナトリウムを利用する手段は、好適に利用される。

【0032】

【実施例】以下に、具体例を示し、本発明をより詳しく説明する。ただし、本発明は、これらの実施例により、なんら限定されるものではない。

【0033】(実施例1)

3HBおよび3HPV含有PHAの生産—1
ノナン酸0.1%を含むM9寒天培地上で生育させたOK4株のコロニーを、ノナン酸0.1%、PVA(5-フェニルペンタン酸)0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に接種し、30℃で培養した。36時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、ノナン酸0.1%、PVA 0.2%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9液体培地(200 mL)に再懸濁して、更に、30℃で36時間振とう培養した。この菌体を、再び遠心分離によって収穫し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0034】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100 mLのクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を0.45 μm のフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。

【0035】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10 mg PHAを25 mL容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム2 mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2 mLを加えて、100℃で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10 mLを加えて、激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した。このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)にかけて、含まれているPHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表5に、同定されたモノマーユニットとその含有率を示す。

【0036】

【表5】

CDW(mg)	PDW(mg)	C/P(%)	3HB	3HV	3HHp	3HN	3HPV
190	82	43	36	57	2	2	3

CDW: cell dry weight (乾燥菌体重量)

PDW: Polymer dry weight (ポリマー乾燥重量)

C/P: ポリマー乾燥重量/乾燥菌体重量

3HB: 3-ヒドロキシ酪酸

3HV: 3-ヒドロキシ古草酸

3HHp: 3-ヒドロキシヘプタン酸

3HN: 3-ヒドロキシノナン酸

3HPV: 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸
(実施例2)

3HB及び3HTVA (3-ヒドロキシ-5-(p-トリル) 吉草酸) 含有PHAの生産

まず、Macromolecules, 29, p.1762-1766 (1996)とMacromolecules, 27, p.45-49 (1994)に記載される方法に従って、グリニャール反応により基質であるTVA (5-(p-トリル) 吉草酸: 5-(p-トリル) ペンタン酸) を合成した。即ち、5-ブプロモ吉草酸を無水THF (テトラヒドロフラン) に溶解させ、 -20°C 、アルゴン雰囲気下で3M メチルマグネシウムクロリドTHF溶液を滴下しながら加えた。約15分間攪拌した後、p-ブプロモトルエンとマグネシウムのTHF溶液を更に滴下し、次いで、 $0.1\text{M Li}_2\text{CuCl}_4$ のTHF溶液を加えた(温度は -20°C に保持)。この反応液を、室温まで戻し、更に一晩攪拌した。その後、この溶液を氷冷した20%硫酸水溶液に注加し、攪拌して、水層を採取した。得られる水層を食塩で飽和し、エーテルで抽出した。更に、エーテル抽出液から、50gの水酸化カリウムを加えた100mLの脱イオン水で抽出した後、水層を20%硫酸水溶液で酸性化して、油状部分を回収した。

【0037】この油状部分を、硫酸マグネシウムで脱水した後、減圧乾燥した。得られた生成物を、重アセトンに溶解して $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ、合成法を開示する原論文のMacromolecules, 29, p.1762-1766 (1996)に示されるTVAのデータと一致した。この生成物をTVA基質として以下の実験に用いた。

【0038】ノナン酸0.1%を含むM9寒天培地上で

CDW (mg)	PDW (mg)	C/P (%)	3HB	3HV	3Hhp	3HN	3HTVA
201	88	44	34	55	3	4	4

CDW: cell dry weight (乾燥菌体重量)

PDW: Polymer dry weight (ポリマー乾燥重量)

C/P: ポリマー乾燥重量/乾燥菌体重量

3HB: 3-ヒドロキシ酪酸

3HV: 3-ヒドロキシ吉草酸

3Hhp: 3-ヒドロキシヘブタン酸

3HN: 3-ヒドロキシノナン酸

3HTVA: 3-ヒドロキシ-5-(p-トリル) 吉草酸

(実施例3)

3HBおよび3HPV含有PHAの生産-2

ラウリン酸0.1%を含むM9寒天培地上で生育させたOK4株のコロニーを、ラウリン酸0.1%、PVA (5-フェニルペンタン酸) 0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に植菌し、 30°C で培養した。36時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、ノナン酸0.1%、PVA 0.2%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9液体培地(200 mL)に再懸濁して、

生育させたOK4株のコロニーを、ノナン酸0.1%、TVA 0.1%を含むM9液体培地(200 mL)に植菌し、 30°C で培養した。36時間後、菌体を遠心分離によって収穫し、ノナン酸0.1%、TVA 0.2%を含む、窒素源(NH_4Cl)を含まないM9液体培地(200 mL)に再懸濁して、更に、 30°C で36時間振とう培養した。この菌体を、再び遠心分離によって収穫し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0039】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100mLのクロロホルムに懸濁し、 60°C で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。

【0040】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10mg PHAを25mL容量型フラスコに入れ、クロロホルム2mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2mLを加えて、 100°C で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10mLを加えて、激しく10分間振とうした後、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した。このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)にかけて、含まれているPHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表6に、同定されたモノマーユニットとその含有率を示す。

【0041】

【表6】

CDW (mg)	PDW (mg)	C/P (%)	3HB	3HV	3Hhp	3HN	3HTVA
201	88	44	34	55	3	4	4

更に、 30°C で36時間振とう培養した。この菌体を、再び遠心分離によって収穫し、冷メタノールで一度洗浄して凍結乾燥した。

【0042】この凍結乾燥ペレットを秤量した後、100mLのクロロホルムに懸濁し、 60°C で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターでろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノール中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量した。

【0043】得られたPHAの組成は以下のようにして分析した。すなわち、約10mg PHAを25mL容量型フラスコに入れ、クロロホルム2mLに溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液2mLを加えて、 100°C で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、脱イオン水10mLを加えて、激しく10分間振とうした後、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、硫酸マグネシウムで脱水した。このクロロホルム層をガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS, 島津QP-5050, EI法)にかけて、含まれて

いるPHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。表7に、同定されたモノマーユニットとその含有率を示す。

【0044】

【表7】

CDW (mg)	PDW (mg)	C/P (%)	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	3HPV
205	109	53	55	18	19	2	3	3

CDW: cell dry weight (乾燥菌体重量)

PDW: Polymer dry weight (ポリマー乾燥重量)

C/P: ポリマー乾燥重量/乾燥菌体重量

3HB: 3-ヒドロキシ酪酸

3HHx: 3-ヒドロキシヘキサン酸

3HO: 3-ヒドロキシオクタン酸

3HD: 3-ヒドロキシデカン酸

3HDD: 3-ヒドロキシドデカン酸

3HPV: 3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸

【0045】

【発明の効果】本発明は、3HBと3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとする

PHAを同時に生産するという特異な性質を有する新規な菌株として、パークホルデリア スピーズ OK4株 (FERM P-17371) を提供するとともに、このOK4株を基質として、5-(4-置換フェニル)吉草酸を含む培地で適当な条件下で培養することで、3HBならびに3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとするPHAを同時に生産することを可能とした。本発明の方法では、3-ヒドロキシ-5-(4-置換フェニル)吉草酸をモノマーユニットとするPHAに加えて、同時に3HBをモノマーユニットとするPHAも高い収率で、簡便に生産することができる利点がある。